

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12P 7/62

C08G 63/66

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00109156.5

[43]公开日 2001 年 12 月 26 日

[11]公开号 CN 1328160A

[22]申请日 2000.6.13 [21]申请号 00109156.5
[71]申请人 中国科学院微生物研究所
地址 100080 北京市海淀区中关村北一条 13 号
[72]发明人 翁维琦 蔡以滨 刘墨青
易祖华 陈 琦

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法

[57]摘要

本发明公开了一种从含有聚羟基烷酸酯的细胞发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯一步分离提取法。本发明属生物工程技术领域。其主要特征是在以真养产碱杆菌发酵生产聚羟基烷酸酯(PHAs)的发酵液中,直接加入表面活性剂、次氯酸钠和变形剂,改变了 PHAs 颗粒的聚集状态,通过普通三足式离心机或过滤即可分离提取 PHAs 颗粒,再经洗涤烘干后,可获得纯度大于 95%、分子量 3.0×10^5 以上的 PHAs 颗粒,提取收率 80% 左右。

ISSN 1008-4274

- 1、一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于以下步骤组成：(1)、在含有聚羟基烷酸酯的细胞发酵液中，调节发酵液 PH 值后，加入阴离子表面活性剂，搅拌反应。(2)、在上述反应体系中加入次氯酸钠、变形剂，搅拌反应。(3)、分离提取固相的聚羟基烷酸酯 PHAs 颗粒。(4)、用水洗涤、干燥得到粉末状聚羟基烷酸酯产品。
- 2、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的 PH 值在 5-14。
- 3、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的表面活性剂为十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、Triton-100 等阴离子表面活性剂。
- 4、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的表面活性剂用量为细胞干重中聚羟基烷酸酯的 1%-30%，反应时间为 0.1-24 小时。
- 5、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的变形剂是次氯酸钠与 NaOH、KOH 等碱性溶液的混合液。
- 6、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的变形剂反应时间为 0.5-30 分钟。
- 7、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的反应温度在 10-100℃。
- 8、如权利要求 1 所述的一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法，其特征在于所述的分离提取方法为过滤或离心收集固相物。

一种从发酵液中直接提取聚羟基烷酸酯的一步分离法

本发明属生物工程技术领域。

聚羟基烷酸酯 (Poly-3-Hydroxyalkanoates, 简称 PHAs) 是微生物在不平衡生长条件下在细胞内积累的一类高分子材料, 是一类物理性质类似于聚丙烯等化学合成塑料的热塑性聚酯, 但它具有一般合成塑料所不具备的一些特性, 如: 生物降解性、生物相容性、压电性、光学活性等, 是替代化学合成塑料最具竞争力的代表之一。特殊的性质使其在工业、农业、医药、卫生、食品等方面具有广泛的应用前景, 成为许多发达国家研究关注的热点。

目前 PHAs 的应用因其生产成本较高并未大量使用, 而取决于生产成本高低和产业化的一个重要因素来自于 PHAs 的后提取。PHAs 的后提取方法一般由 3 种: (1) 有机溶剂法。此法的缺点是需要大量的有机溶剂, 如三氯甲烷 (欧洲专利 46, 017)、二氯甲烷 (欧洲专利 58, 480)、丙酮、甲烷等, 成本高, 工作环境恶劣, 劳动保护要求高, 提取收率低。(2) 次氯酸钠法 (Biotechnology Techniques, 3(4):227-230, 1989)。由于次氯酸钠具有很强的氧化性, 提取过程使 PHAs 的分子量受到很大影响, 为此, 又有人提出表面活性剂-次氯酸钠法 (Biotechnology Techniques, 4(4):221-226, 1990), 虽然此法 PHAs 分子量的降解作用明显降低, 但提取过程中需对细胞进行预处理, 离心弃去发酵液, 并在二步反应之间需对混合液进行固液分离, 由于微生物细胞直径很小, 需采用高速离心机, 在大规模生产中很难实现, 工艺复杂, 收率低, 高速离心是影响 PHAs 大规模后提取的瓶颈。并且反应体系中细胞浓度不超过 100 克 (干重细胞) /升, 存在很大的局限性。(3) 酶-表面活性剂法 (美国专利 4, 101, 533, 欧洲专利 0 145 233 A2)。此法的缺点亦在于需首先进行细胞预处理, 并通过细胞热处理、酶处理和阴离子表面活性剂处理, 才能得到高纯度的 PHAs。工艺复杂, 酶反应条件苛刻, 并同样在每步反应之后需通过高速离心进行固液分离, 成本高, 工程放大困难。

本发明的目的在于 PHAs 的后提取工艺, 无需细胞的预处理, 无需高速离心机, 并对细胞的高密度培养体系均适用。利用一般发酵工厂的普通

提取设备，二步反应一步离心或过滤，即可得到高纯度的 PHAs。本发明工艺简单，成本低，劳动强度低，提取收率高，为规模化生产提供条件。

本发明的具体操作步骤如下：

- (1) 在利用微生物发酵法生产 PHAs 的细胞发酵液中，用 NaOH 溶液调节发酵液 PH 值分别为 5.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、14.0，其中 PH10.0 作为优选 PH 值。
- (2) 加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、Triton-100、十二烷基磺酸钠等，其中十二烷基硫酸钠价格低、提取效果好，作为优选表面活性剂。搅拌反应。
- (3) 加入次氯酸钠、变形剂，搅拌反应。变形剂分别采用 NaOH、KOH、氨水等碱性溶液，其中优选 NaOH 溶液作为变形剂。
- (4) 离心或过滤上述混合物。
- (5) 将得到的固形物用水洗涤并干燥即得 PHAs 成品。

本发明适用性强，不仅可处理聚羟基烷酸酯中的均聚物（PHB），而且可处理聚羟基丁酸-羟基戊酸（PHBV）等共聚物，并对发酵液中的细胞浓度或细胞中 PHA 含量无要求，甚至可直接处理细胞浓度在 160 克（干重）/升发酵液以上的发酵产物，放大容易，并已在吨级规模上得到验证。

实施例 1

提取对象：细胞内含聚 3-羟基丁酸酯（PHB）的发酵液 50ml

细胞浓度：164.4 克（干重）/升发酵液

PHA 含量：细胞干重的 80%

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：0.2：1（w/w）

次氯酸钠用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：5：1

本实施例的具体步骤如下：

在 50ml 发酵液中滴加 30%NaOH 溶液调节发酵液 PH10，加入表面活性剂十二烷基硫酸钠 0.4 克（加水加热溶解后倒入），搅拌反应 10 分钟后，加入次氯酸钠溶液 4.5ml 和变形剂溶液 4.5ml，搅拌反应 5 分钟至固体析出即进行过滤，自来水洗涤后置 70℃烤箱干燥至恒重。成品经气相色谱分析

纯度为 99.5%，粘均分子量 $6.9 \times 10^5 \text{Da}$ ，提取收率 81.8%。

实施例 2

提取对象：细胞内含聚 3-羟基丁酸酯（PHB）的发酵液 100ml

细胞浓度：107.0 克（干重）/升发酵液

PHA 含量：细胞干重的 60.25%

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：0.5：1
(w/w)

次氯酸钠用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：8：1

本实施例的具体步骤如下：

在 100ml 发酵液中滴加 30%NaOH 溶液调节发酵液 PH10，加入表面活性剂十二烷基硫酸钠 2.3 克（加水加热溶解后倒入）搅拌后，反应 19 小时，加入次氯酸钠溶液 21ml 和变形剂溶液 16ml，搅拌反应至固体析出即进行过滤，自来水洗涤后置 70℃烤箱干燥至恒重。成品经气相色谱分析纯度为 98.2%，粘均分子量 $4.6 \times 10^5 \text{Da}$ ，提取收率 78%。

实施例 3

提取对象：细胞内含聚 3-羟基丁酸酯（PHB）的发酵液 50mL

细胞浓度：164.4 克（干重）/升发酵液

PHA 含量：细胞干重的 80%

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：0.4：1
(w/w)

次氯酸钠用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：8：1

本实施例的具体步骤如下：

在 50mL 发酵液中加入 15%NaOH 溶液调节发酵液 PH10，加入表面活性剂十二烷基苯磺酸钠 0.66 克（加水加热溶解冷却后倒入），搅拌反应 20 分钟后，加入次氯酸钠溶液 8mL 和变形剂溶液 8.1mL，搅拌反应至固体析出即进行过滤，自来水洗涤后置 70℃烤箱干燥至恒重。成品经气相色谱分析纯度为 99.0%，粘均分子量 $5.2 \times 10^5 \text{Da}$ ，提取收率 72%。

实施例 4

提取对象：细胞内含聚 3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯（简称 PHBV，HV

含量为 PHBV 的 10%）的发酵液 100ml

细胞浓度：128.8 克（干重）/升发酵液

PHA 含量：细胞干重的 80%

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：0.3：1
(w/w)

次氯酸钠用量与细胞干重中非 PHA 物质质量之比：6：1

本实施例的具体步骤如下：

在 100ml 发酵液中滴加 30%NaOH 溶液调节发酵液 PH10，加入表面活性剂十二烷基硫酸钠 0.8 克（加水加热溶解后倒入），搅拌反应 10 分钟后，加入次氯酸钠溶液 11ml 和变形剂溶液 6.0ml，搅拌反应 30 分钟至固体析出即进行过滤，自来水洗涤后置 70℃烤箱干燥至恒重。成品经气相色谱分析纯度为 97%，粘均分子量 6.0×10^5 Da，提取收率 85%。